

平成21年 5月 1日現在

研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2004～2008
 課題番号： 16085201
 研究課題名（和文） イネの窒素情報伝達と代謝に関わる未熟非緑色器官におけるプラスチック機能の解明
 研究課題名（英文） Integration of nitrogen signaling and nitrogen metabolisms in rice
 研究代表者
 山谷 知行 (YAMATA, TOMOYUKI)
 東北大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号： 30144778

研究成果の概要： イネの窒素転流は、成育や生産性に直接関わる。老化器官からの転流と、若い器官での再利用に関わる高次機能に焦点をあて、グルタミン情報伝達系の分子実体の解明と、窒素利用効率向上戦略に関わる高次機能発現の分子基盤を確立した。グルタミン情報受容体候補分子の特性、GS1;1 遺伝子破壊変異体のメタボローム解析、根の伸長を促進する QTL などから、窒素利用におけるイネの高次機能の発現に関する理解が格段に深まった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	9,800,000	0	9,800,000
2005年度	9,800,000	0	9,800,000
2006年度	20,500,000	0	20,500,000
2007年度	20,500,000	0	20,500,000
2008年度	18,800,000	0	18,800,000
総計	79,400,000	0	79,400,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目：

キーワード： オルガネラ、分化、環境適応、代謝性、高次機能、植物分子

1. 研究開始当初の背景

植物を、異なる機能をもつ多細胞生物と捉える視点が、研究開始当初のポストゲノム研究には欠落しており、特定細胞で営まれる窒素利用機構の解明と、グルタミン (Gln) による窒素代謝の高次機能発現に関わるプラスチック機能を探索する研究はなかった。逆遺伝学や QTL 解析等により窒素代謝・炭素代謝・農業形質の制御に関わる遺伝子の探索を行うことが可能であると考えられ、細胞機能の分担と個体としての統合機構の解明をめざす本研究は、先端的かつ社会的にも重要である。

2. 研究の目的

イネにおける窒素転流は、成育や生産性に直接関わる。老化器官からの窒素転流と、若い器官における窒素再利用に関わる高次機能に焦点をあて、(1)グルタミンを情報物質とした情報伝達系の分子実体の解明と、(2)個体としての窒素利用効率向上戦略に関わる高次機能発現の分子基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)グルタミン情報の受容体探索

・バクテリアのGln情報伝達系を参考に、Gln受容体としてアミノ酸結合(ACT)ドメインを持つ遺伝子を探索した。

・C/Nバランスを検知するとされるPIIタンパク質機能解明のため、発現解析とノックダウン変異体を作成して機能解析を行った。

(2)窒素利用の高次機能発現

・サイトゾル型グルタミン合成酵素(GS1)とプラスチド型NADH-グルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT)の遺伝子族それぞれの遺伝子破壊変異体をスクリーニングし、機能解析を進めた。

・GS1;1変異体を用いて、トランスクリプトーム解析とメタボローム解析を行い、変異体における代謝の攪乱と、新たな代謝ネットワーク形成を解析した。

・外来窒素に応答して根の伸長と窒素吸収を促進するQTL領域から、原因遺伝子を単離した。

4. 研究成果

(1)グルタミン情報の受容体探索

PII様タンパク質遺伝子は1コピーであり、



遺伝子産物は葉緑体に局在していた。PII様タンパク質と相互作用するタンパク質を、酵母ツーハイブリッド法で検索した結果、PII様タンパク質そのものと、N-アセチルグルタミン酸

キナーゼ(AGK)が同定された。AGKタンパク質も葉緑体に局在していることを確認し、*in vivo*でも相互作用することが期待された(上挿入図)。RNAi法によるノックダウンイネを作成し、トランスクリプトーム解析を行った。

ACTドメインをタンデムで4つもつACR7タンパク質の若い葉身維管束柔細胞での核膜局在や、分子シャペロンHSP18.0-CIIタンパク質との相互作用などに関して、国際学術雑誌に報告した。同様に若い葉身で転写産物蓄積量が多いACR9は、核の可溶性画分に局在することを確認した。組織内局在を免疫学的に調べ、ACR9の分布がGlnで発現制御を受けるNADH-GOGAT1タンパク質と極めて類似していることを見だし、その成果を報告した。ACR9タンパク質の機能解明のため、ACR9遺伝子ノックダウンイネを作成し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、Glnで制御を受ける可能性のある複数の遺伝子をスクリーニングできた。また、酵母を用いて、ACR9と相互作用する転写因子様タンパク質を同定できた。もう一方のセンサー候補であるACTPK4の発現用式の解析や、レトロトランスポゾンTos17挿入による遺伝子破壊変異

体を獲得し、このタンパク質の機能解析を行った。まだ、Glnセンサーである確証は得られていない。

(2)窒素利用の高次機能発現

イネの老化器官からの窒素転流に重要な機能を持つことが示唆されていたサイトゾル型グルタミン合成酵素(*OsGS1;1*)遺伝子がレトロトランスポゾン*Tos17*の挿入により破壊された変異体について、詳細に解析した。この変異体は、極端な成育遅延や登熟障



害を示した(左挿入図)。この表現型が*OsGS1;1*の欠損によることを、この遺伝子のプロモーター

制御下にcDNAを連結したキメラ遺伝子を導入することで機能相補されることから証明した。これらの結果をまとめて、国際学術雑誌に公表した。また、GS1とNADH-GOGAT小遺伝子族の発現様式を詳細に調べ、窒素代謝における役割分担を論議し、招待論文としてその成果を公表した。

NADH-GOGAT2は、NADH-GOGAT1と極めて類似したタンパク質であり、トランジット配列の類似性から、本タンパク質もプラスチド/葉緑体に局在しているものと考えられ、*OsNADH-GOGAT1*の未熟器官での特異的な発現とは異なり、*OsNADH-GOGAT2*は成熟葉身や葉鞘で主に発現が観察された。穎果特異的に発現する*OsGS1;3*に関して、発芽過程での発現様式をプロモーター::GUSの形質転換種子で観察した。*OsGS1;3*は吸水前から主にアリューロン層で発現しており、*OsGS1;2*の胚盤での発現とは異なっていた。GS1;1, 1;2, 1;3とNADH-GOGAT1と2の遺伝子破壊変異体をそれぞれ獲得し、変異体を用いての機能解析を進めている。同時にGS1;1変異体を用いてメタボローム解析を進め、代謝ネットワークの変化やC/Nバランスの著しい変化を確認でき、現在、その成果をまとめて公表準備を進めている。

シンク器官のプラスチドで転流窒素の再利用を行うNADHグルタミン酸合成酵素の反応に、炭素骨格である2-オキソグルタル酸を供給する代謝系を、イネの根を用いて詳細に調べ、発現時期や発現場所の類似性から、ミトコンドリアに局在するイソクエン酸脱水素酵素であることを示し、その成果を国際学術雑誌に公表した。

コシヒカリを遺伝背景として、第2染色体の一部約40cMがインド型イネ*Kasalath*に置換された系統C-22を用いて、QTL解析で観察

されたGS1タンパク質含量や穂数に関する表現型が実際に検出されることを、ガラス室ならびに圃場での栽培で示した。また、第6染色体に見いだされた、根長と窒素吸収を促進する遺伝子をQTL領域から単離した。この遺伝子は転写活性化因子をコードしており、酵母を用いた系で転写因子であることの確認を行った。日本型イネでは、この遺伝子は成熟タンパク質となっており、根の伸長や窒素吸収の促進は認められない。一方で、インド型イネの多くはこの遺伝子の途中で停止コードができており、成熟タンパク質は発現しない。この状態で表現型を示す、Loss of Function型の因子であることが判明した。インド型イネへのこの遺伝子領域を導入することで相補検定を確認し、現在、この転写因子の標的遺伝子を探索中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計16件)

下記の論文は、全て査読有りである。

1. Tanaka, T., Suzui, N., Hayashi, H., Yamaya, T. and Yoneyama, T. (2009) Cytosolic glutamine synthetase is present in phloem sap from rice (*Oryza sativa* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 55(1): 102-106.
2. Kudo, T., Kawai, A., Yamaya, T. and Hayakawa, T. (2008) Cellular distribution of ACT domain repeat protein 9, a nuclear localizing protein, in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiol. Plant.* 133(2): 167-179.
3. Sugawara, H., Ueda, N., Kojima, M., Makita, N., Yamaya, T. and H. Sakakibara (2008) Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(7): 2734-2739.
4. Suzuki, Y., Ohkubo, M., Hatakeyama, H., Ohashi, K., Yoshizawa, R., Kojima, S., Hayakawa, T., Yamaya, T., Mae, T. and Makino, A. (2007) Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with "sense" *rbcs* gene. *Plant Cell Physiol.* 48(4): 626-637.
5. Tabuchi, M., Abiko, T. and Yamaya, T. (2007) Assimilation of ammonium-ions and re-utilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 58(9): 2319-2327.
6. Unno, H., Uchida, T., Sugawara, H., Kurisu, G., Sugiyama, T., Yamaya, T., Sakakibara, H., Hase, T. and Kusunoki, M. (2006) Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *J. Biol. Chem.* 281: 29287-29296.
7. Hayakawa, T., Kudo, T., Ito, T., Takahashi, N. and Yamaya, T. (2006) ACT-domain repeat protein 7, ACR7, interacts with a chaperon HSP18.0-CII in rice nuclei. *Plant Cell Physiol.* 47: 891-904.
8. Takehisa, H., Ueda, T., Fukuta, Y., Obara, M., Abe, T., Yano, M., Yamaya, T., Kameya, T., Higashitani, A. and Sato, T. (2006) Epistatic interaction of QTLs controlling leaf bronzing in rice (*Oryza sativa* L.) grown in a saline paddy field. *Breeding Sci.* 56(3): 287-293.
9. Ishiyama, K., Inoue, E., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2006) Gln-49 and Ser-174 residues play critical roles in determining the catalytic efficiencies of plant glutamine synthetase. *Plant Cell Physiol.* 47(2): 299-303.
10. Fukuta, A., Fujimaki, S., Mori, T., Suzui, N., Ishiyama, K., Hayakawa, T., Yamaya, T., Fujiwara, T., Yoneyama, T. and Hayashi, H. (2005) Differential distribution of proteins expressed in companion cells in the sieve element-companion cell complex of rice plants. *Plant Cell Physiol.* 46(11): 1779-1786.
11. Abiko, T., Obara, M., Ushioda, A., Hayakawa, T., Hodges, M. and Yamaya, T. (2005) Localization of NAD-isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in rice: Candidate for providing carbon skeletons to NADH-glutamate synthase. *Plant Cell Physiol.* 46: 1724-1734.
12. Tabuchi, M., Sugiyama, K., Ishiyama, K., Inoue, E., Sato, T., Takahashi, H. and Yamaya, T. (2005) Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking *OsGS1;1*, a cytosolic glutamine synthetase1. *Plant J.* 42(5): 641-651.
13. Ishiyama, K., Inoue, E., Tabuchi, M., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2004) Biochemical backgrounds of compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. *Plant Cell Physiol.* 45 (11): 1640-1647.
14. Sugiyama, K., Hayakawa, T., Kudo, T., Ito, T. and Yamaya, T. (2004)

Interaction of acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice. *Plant Cell Physiol.* 45: 1768-1778.

15. Obara, M., Sato, T., Sasaki, S., Kashiba, K., Nakamura, I., Ebitani, T., Yano, M. and Yamaya, T. (2004) Identification and characterization of QTL on chromosome 2 for cytosolic glutamine synthetase content and panicle number in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genetics* 110: 1-11.
16. Ishiyama, K., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Obara, M., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2004) Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetases in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 279: 16598-16605.

[主な学会発表] (計 19 件)

1. 6. 山谷知行 2009 イネのアンモニウムイオン欠乏に対する応答機構。植物ストレス科学研究ネットワーク発足シンポジウム「ストレスと戦う植物の戦略と次世代作物の作出」(倉敷市芸文館アイシアター、2月23-24日)(招待講演)
2. Obara, M. and Yamaya, T. 2008 Genetic and physiological approach of nitrogen utilization toward improving environmental adaptation of rice. Workshop on Development of Environmentally-friendly Water-saving Technologies for Rice (JIRCAS Conference Room, Tsukuba, June 18, 2008) (invited)
3. Yamaya, T. 2008 Molecular mechanisms for plant biomass production - rice as a model plant. UCR Tech Horizon 2008 Conference (UC Riverside, CA, USA May 13-14, 2008) (invited)
4. Yamaya, T. 2007 Assimilation of ammonium ions and re-utilization of nitrogen in rice. Nitrogen2007 - An International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants (Lancaster University, UK, July 27-31) (invited)
5. Obara, M., Tamura, W., Ono, H., Ebitani, T., Yano, M., Sato, T. and Yamaya, T. 2006 Identification and characterization of quantitative trait loci in nitrogen utilization of rice. The 100th Anniversary of Tohoku University International Symposium: Frontiers in Rice Science - from Gene to Field-. (Sendai International Center, Sendai, Nov. 6-7) (invited)
6. Tabuchi, M., Hayakawa, T. and Yamaya, T. 2006 Mechanism of nitrogen remobilization in rice. The 100th Anniversary of Tohoku University International Symposium: Frontiers in Rice Science - from Gene to Field-. (Sendai International Center, Sendai, Nov. 6-7) (invited)
8. Yamaya, T. 2006 Nitrogen utilization in rice: molecular, physiological and genetic analyses. Sino-Japanese Workshop on Plant Nutrition. (Yunnan Agricultural University, Kunming, China, Sept. 12-16) (invited)
9. Yamaya, T., Tabuchi, M. and Obara, M. 2006 Comprehensive Approaches for Understanding Mechanisms of Nitrogen Utilization in Rice. The 53rd NIBB Conference: Dynamic Organelles in Plants. (NIBB, Okazaki, June 14-17) (invited)
10. Yamaya, T., Obara, M., Tabuchi, M. and Sato, T. 2005 Mechanisms of nitrogen utilization and genetic approaches for improvement of rice yield. The Symposium on Molecular and Cellular Biology of Plant Storage Function - from Gene to Food. (Nagoya Univ., Nov. 28-29) (invited)
11. Hayakawa, T., Sugiyama, K. and Yamaya, T. 2005 Glutamine sensor and signaling in rice. Xth France-Japan Workshop on Plant Sciences: Cellular signaling and development. (Toulouse, France, Sept. 25-29) (invited)
12. 早川俊彦、山谷知行 2005 イネの窒素の栄養生理と生産性の分子的基盤。(日本土壤肥料学会 2005 年度島根大会シンポジウム、島根大学、2005 年 9 月 8 日)
13. Yamaya, T. 2005 Nitrogen utilization in rice: From the aspect of molecular biology and molecular genetics. Invited Seminar at Crop Performance and Improvement Division, Rothamsted Research, (Harpenden, UK., June 1) (invited)
14. Tabuchi, M. and Yamaya, T. 2005 Characteristics of rice mutants lacking *OsGS1;1*, a cytosolic glutamine synthetase1;1 gene. 6th International Workshop on Plant Sulfur Metabolism: physiological, molecular biochemical, ecological, environmental, agricultural, nutritional, nutra-pharmaceutical aspects. (Kazusa Akademia Center, Kisarazu, Japan May

- 17-21) (invited)
15. 山谷知行 2004 イネにおける窒素利用機構と生産性向上。岩手大学 21 世紀 COE プロジェクト「熱-生命システム相関学拠点創成」第 1 回シンポジウム特別講演。(岩手大学、11 月 4 日)
 16. 山谷知行 2004 イネにおける窒素代謝のメカニズム。日本育種学会シンポジウム「植物栄養特性の育種への利用-窒素栄養と遺伝・育種学」。(三重大学、2004 年 9 月 20-22 日)
 17. 小原実広、佐藤雅志、矢野昌裕、山谷知行 2004 イネの窒素利用と穂数を決定している遺伝子座の解析。日本植物学会第 68 回大会シンポジウム「植物種子における炭素/窒素代謝ネットワークの制御」。(日大湘南キャンパス、2004 年 9 月 10-12 日)(招待講演)
 18. Yamaya, T., Obara, M., Yano, M., Sato, T. 2004 Chromosome-substituted lines confirmed QTL on chromosome 2 for GS1 protein content and tiller number in rice. The 7th International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation in Plants: from the genome to the agro-ecosystem (Wageningen, The Netherlands, June 23-27)
 19. Yamaya, T. 2004 Molecular mechanisms for nitrogen recycling in rice. INRA-Seminar, (INRA, Versailles, France, Jan. 13) (invited)

[図書] (計 9 件)

1. Kojima, K., von Wiren, N. and Yamaya, T. (2009) Ammonia absorption and assimilation in plants. In: Nitrogen Assimilation in Plants, Research Signpost, India, in press.
2. 山谷知行(2009) 細胞内アンモニア代謝、アンモニオトランスポーター。植物栄養学第 2 版。間藤徹、馬建鋒、藤原徹 編、文永堂出版 印刷中、東京
3. 山谷知行 (2009) 1.2 物質代謝。植物の百科事典。pp. 13-14 (全 552 ページ)。朝倉書店
4. 山谷知行 (2009) b 窒素代謝。植物の百科事典。pp. 16 (全 552 ページ)。朝倉書店
5. 山谷知行 (2006) 水稻の窒素利用に関する分子生物学的アプローチ。東北の農業と土壤肥料。2006 年度秋田大会記念誌。pp. 141-143 (全 298 ページ)。日本土壤肥料学会東北支部編。
6. 早川俊彦、山谷知行 (2006) イネの窒素の栄養生理と生産性の分子的基盤。イネの生産性・品質と栄養生理。日本土壤肥料学会編。pp. 10-37 (全 168 ページ) 博友社。

7. Srivastava, H.S., Shankar, N., Yamaya, T. and Singh, R.P. (2006) Glutamate syntase, ammonia assimilation and plant productivity. In "Focus on Plant Molecular Biology-2: Biotechnological Approaches to Improve Nitrogen Use Efficiency in Plants", Eds. by Singh, R.P. and Jaiwal, P.K., pp. 135-166, Studium Press, LLC, Houston, Texas, U.S.A.
8. 山谷知行 (2004) 植物ゲノム科学事典。駒嶺穆ら編。朝倉書店
9. Yamaya, T. and Oaks, A. (2004) Metabolic Regulation of Ammonium Uptake and Assimilation. In "Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants", Plant Ecophysiology Series, Eds. by Stulen, I. and Amancio, S., pp. 35-64, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://www.agri.tohoku.ac.jp/cellbio/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山谷 知行 (YAMAYA, TOMOYUKI)
 東北大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：30144778

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

早川 俊彦 (HAYAKAWA, TOSHIHIKO)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：60261492